METABOLOMICS GENOMICS INFORMATICS PROTEOMICS

# LC/MS-TOF、LC/Q-TOF と多変量解析ソフト GeneSpring MS を用いたイネの細菌性白葉枯れ病（BLB: Bacterial Leaf Blight）のメタボロミックプロファイリング

著者

Steven Fischer
Senior Application Chemist
Agilent Technologies
Santa Clara, California U.S.A

Theodore Sana
Senior Research Scientist
Agilent Laboratories
Santa Clara, California U.S.A

**要旨**

**コメ (学名：アジアイネ *Oryza sativa*、アフリカイネ *Oryza glaberrima*) は、世界の最も重要な農産物の一つです。*Xathomonas oryzae pv. oryzae (Xoo)* 細菌により生じるイネの細菌性白葉枯れ病 (BLB) は、最高 50% の作物の損失を引き起こします。現在のところ、耐性を持つイネ品種の栽培が、BLB に効果がある最も経済的で効果的な方法です。*Xoo* とイネの相互作用はイネの耐性遺伝子に影響され、病因となる *Xoo* の非病原性遺伝子に対応します。**

**BLB に対するイネの感染や免疫のメカニズムをよく理解するために、感染や抵抗力に関連する代謝物を同定する研究を行いました。*Xoo* 細菌株 PXO99 による感染に感受性を持つ TP309 と遺伝子組み換え系統である TP309-Xa21 の 2 種類のイネ系統を研究しました。さらに、PXO99 での *raxST* 遺伝子不活性化の影響を、TP309-Xa21 の抵抗力への影響に関して評価しました。適切なコントロールも含んでいます。**

**2 つの LC/MS 手法を採用しました。Time-of-Flight (TOF) 質量分析計 (MS) によるサンプルの高速異差発現分析の後、Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) MS/MS を用いて差次的に発現した代謝物の標的同定を行いました。さまざまなイネ/細菌の組み合わせの代謝物プロファイルで明確な違いが検出されました。比較的少ない代謝物に基づき、イネ系統と感染の状態を明確に区別できました。**

## はじめに

コメ (*Oryza sativa* と *Oryza glaberrima*) は、世界中で 30 億人以上の主食です。6 億人以上が摂取カロリーの半分以上をコメから得ています。コメは、小麦とトウモロコシに次ぐ 3 番目に大きな商品作物です。2005 年には、世界中で 7 億トンが生産され、市場価値は 1 億 2000 万米ドルでした。世界中のコメの潜在収量の 50% が、細菌、菌類、ウイルスにより起きる疾病で失われていると推定されています。2005 年には、疾病により 3 億トンが失われました。

アフリカやアジアのイネの最も深刻な細菌性疾患の 1 つが、*Xanthomonas oryzae pv. oryzae (Xoo)* によって起こる細菌性白葉枯れ病 (図 1) です。BLB は最も古くから記録されている疾病の 1 つで、数世紀以上にわたり問題となってきました。*Xoo* はイネからイネへ、水田から水田へ、水滴で急速に広がります。感染した葉が黄変の病変へと変わり、数日中に枯れます。深刻な影響を受けた水田では、細菌性葉枯れ病により農家のイネ作物の半分が失われる可能性があります。

主要な抵抗遺伝子を持つ耐性品種の品種改良や開発が、BLB に効果がある最も効率的な方法でした。このような遺伝子の 1 つ *Xa21* は、イネ品種 Taipei 309 (TP309) へのクローン化に成功しました [1]。一旦クローン化すると、自家受精により *Xa21* を次世代へ伝えることができます。

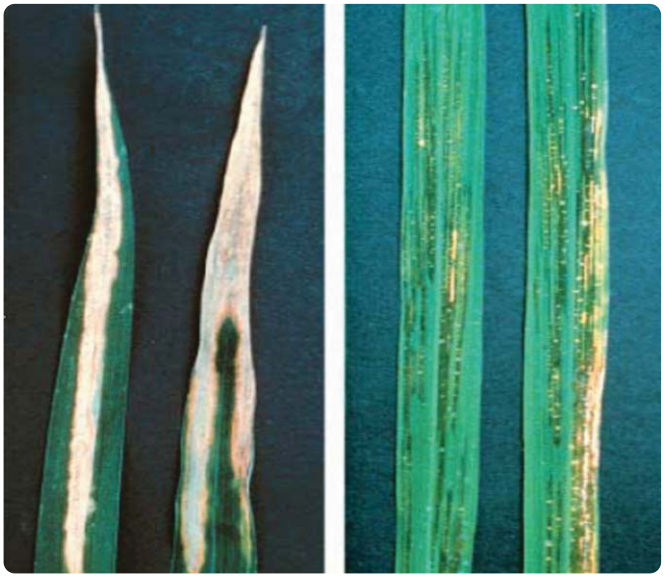


**図 1. 細菌性白葉枯れ病に感染したイネの葉 (左) と未感染のイネの葉 (右)**

遺伝子 Xa21 のタンパク質産物は、ロイシンに富んだ反復モチーフとセリン - スレオニンのキナーゼ様領域の両方を持ち、病原菌リガンドの細胞表面認識と細胞内防御応答の二次的活性化での役割を示します。この受容体は、病原菌によって符号化された対応する非病原性 (*avr*) 遺伝子産物 (この場合、*Xoo* の AvrXa21 ペプチド) を経由して作成されたシグナルを直接的または間接的に「認識」します。この推定受容体 - リガンド複合体の形成を仮定し、病原菌の成長を食い止める防御応答のシグナル伝達系到達を開始します [2]。

免疫反応を引き出し、*Xoo* に感染しないためには、耐性を持つイネ系統 TP309-Xa21 に AvrXa21 が存在する必要があります。*Xoo* の *raxST* 遺伝子により、AvrXa21 ペプチドの生成に必要な硫酸転移酵素様タンパク質を符号化します。この実験では、2 つの細菌株を使用しました。病原性細菌 *Xoo* 株 PXO99 には *raxST* 遺伝子が含まれ、AvrXa21 ペプチドを生成します (図 2)。*raxST* 不活性株、PXO99-raxST⁻ は、AvrXa21 ペプチドを生成しません。

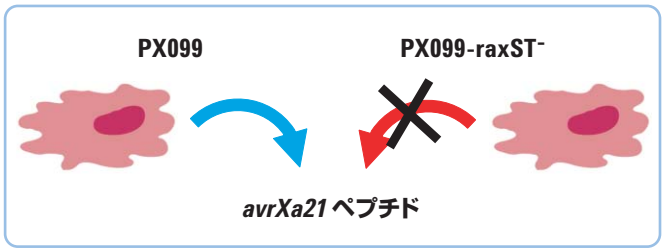



**図 2. *Xoo* 中の遺伝子 *raxST* は、耐性を持つイネ系統 TP309-Xa21 の免疫反応を引き出す AvrXa21 ペプチドの生成に必要な硫酸転移酵素様タンパク質を符号化します。この実験では、2 つの細菌株を使用しました。野生型 PXO99 には *raxST* 遺伝子が含まれ、AvrXa21 を生成します。*raxST* 不活性の PXO99-raxST⁻ には *raxST* 遺伝子が欠如しており、AvrXa21 を生成しません**

BLB に対するイネの感染と免疫のメカニズムを詳しく考察するため、LC/MS 代謝物プロファイリングを採用した研究を行い、感染と抵抗に関連する代謝物を検出し、同定しました。Agilent 1200 シリーズ LC と Agilent 6210 Time-of-Flight LC/MS から構成される LC/MS システムは 2 ppm 未満の精密質量精度、優れた再現性、堅牢性を持つため、このプロファイリング作業を行うために選択しました。Agilent GeneSpring MS バイオインフォマティクスソフトウェアを使用し、本研究で作成された複雑な多分類データ（multi-class data）を解析しました。

Agilent 1200 シリーズ LC と Agilent 6510 Quadrupole Time-of-Flight LC/MS を組み合わせた Agilent LC/MS システムを選択し、コントロールサンプルと実験サンプルの間でアバンダンスの統計的に大きな差があることが分かる代謝物を同定しました。精密質量測定と MS/MS スペクトルの測定が行えるこの 2 システムを選択しました。METLIN パーソナル代謝物データベースを使用し、可能性のある ID のリストを絞り込みました。

コントロールとともに本研究には、2 つのイネ系統 (TP309 と遺伝子組み換え TP309-Xa21) と 2 つの細菌株 (PXO99 と PXO99-raxST$^{-}$)を用いました。表 1 のように、合計 7 つの異なる分類を調査しました。イネと細菌両方の自然変動により、複数の生物学的繰り返し実験が必要でした。前述した LC/MS システムの再現性に基づき、本研究では技術的繰り返し実験は必要ありませんでした。

TP309 の細菌感染に対する防御の誘出と TP309-Xa21 の抵抗に関与する可能性のあるいくつかのバイオマーカーを同定しました。相対的に少ない代謝物に基づき、2 つのイネ系統、感染の状況、各イネ系統内での感染の状況はすべて明確に区別されました。

**表 1. テスト条件と各条件に使用した生物学的複製物の数**

| 条件 (分類) | TP309 (野生型) | TP309-Xa21 (遺伝子組み換え) |
|---|---|---|
| PXO99 (野生型) | 6 | 6 |
| Mock 処理コントロール | 6 | 6 |
| 未処理 (NT) コントロール | 6 | 6 |
| PXO99-raxST$^{-}$ (raxST 不活性) | NA | 6 |

## 実験

### イネの菌接種

*Xoo* 細菌株 (PXO99 と PXO99-raxST$^{-}$) を、ペプトンスクロース寒天 (Tsuchiya ら、1982 年) を用いて、30 °C で 72 時間育てました。6 週間のイネ (TP309 と TP309-Xa21) を、$10^9$ 細胞/mL (Kauffman ら、1973 年) の細菌懸濁液またはペプトンスクロース寒天 (模擬条件) に浸したハサミで、完全に伸ばした葉の先端から約 4 cm で切断しました。菌接種後、イネを栽培箱の中で維持し、成長するまで放置しました。

### イネサンプルの前処理

以下の変更を行い、Weckwerth ら[3] に従い、サンプルを処理しました。約 20 mg のイネの葉を切断し、秤量しました。5 mm のステンレスボールベアリングの入った液体窒素冷却 2 mL エッペンドルフチューブに、この断片を入れました (図 3)。液体窒素で予め冷却した MM301 Retsch Mill アダプタラックにこのチューブを移しました。25 Hz で 30 秒間、サンプルを均質化させました。1 mL の溶媒 (水/アセトニトリル/イソプロパノールの 2:3:3 v/v/v 混合物) を –20 °C で使用し、均質化したサンプル中の膜と細胞壁成分から代謝物を抽出しました。抽出を最小限に抑え、LC/MS と GC/MS の両方で分析できるように、この溶媒システムを選択しました。

### LC/MS 分析

ZORBAX SB-Aq カラム 2.1 x 150 mm を装備した Agilent 1200 LC を使用し、イネ抽出物を分離しました。容量 1 mL のサンプルから 2 μL の注入を行いました。流量 0.3 mL/min で、46 分間、水/アセトニトリルの 2% ～ 98% の直線的グラジエントを行った後、時間データ採取を停止する 54.9 分まで溶媒を保持しました。移動相モデファイアとして、0.1% ギ酸を使用しました。

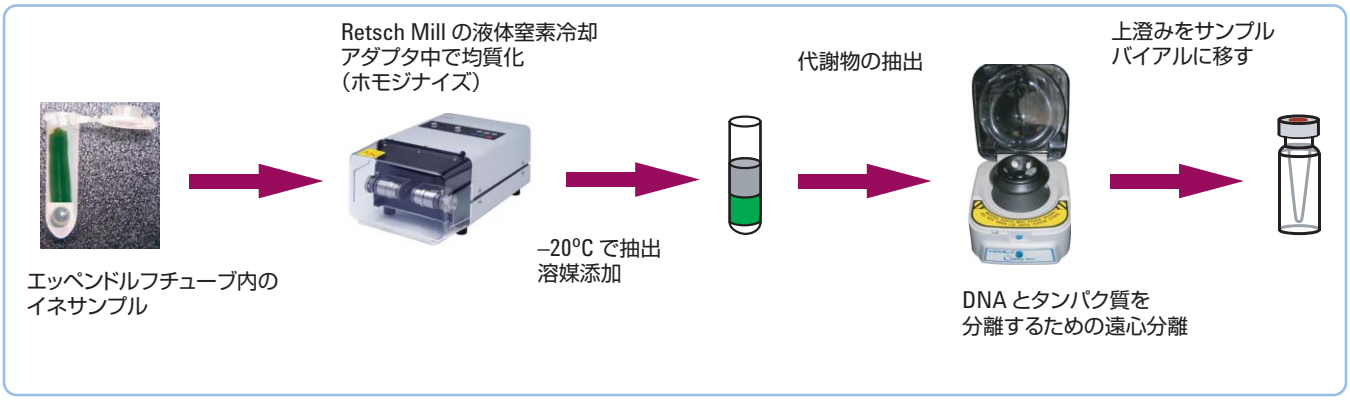



**図 3. イネの葉サンプルのサンプル前処理ワークフロー**

エレクトロスプレー (ESI) イオン源を搭載した Agilent 6210 Time-of-Flight LC/MS を使用し、プロファイリングデータを取り込みました。ESI イオン源には、リファレンスマス化合物の連続低濃度導入を行うための独立ネブライザを装備しています（デュアルスプレー）。リファレンスマス化合物は、機器ドリフトの補正を容易にします。*m/z* 50 ～ 950 にわたり、ポジティブとネガティブ両方のイオンモードで、1 MS スペクトル/秒の速度でデータを採取しました。

エレクトロスプレー（ESI）イオン源を搭載した Agilent 6510 Quadrupole Time-of-Flight LC/MS を使用し、代謝物同定のための精密質量 MS/MS データを採取しました。ESI イオン源には、リファレンスマス化合物の連続低濃度導入を行い、質量精度を最大限に引き上げるための独立ネブライザを装備しています（デュアルスプレー）。

## データ解析

精密質量 MS プロファイリングデータの初期解析は、Agilent MassHunter ソフトウェアを用いて行いました。MassHunter ソフトウェアの特徴ピーク抽出（Feature extraction）および補正アルゴリズム (correlation algorithm) により、各クロマトグラムの共変異イオン(co-variant) のグループを見つけます。これらの各グループは固有の化合物を示しました。このように、このアルゴリズムでは、微少で隠れているクロマトグラフピークを見つけるプロセスとノイズ除去機能を使って、クロマトグラム中のすべての化合物を見つけだしました。

**機器条件 – LC/TOF MS**

**LC 条件**

カラム: ZORBAX SB-Aq カラム 2.1 x 150 mm、3.5 µm
移動相:
　A = 0.1% ギ酸水溶液
　B = 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント:
　2% B 0 分
　98% B 46 分
　98%B 54.9 分
　2% B 55 分
MS stop 時間: 54.9 分
LC stop 時間: 55 分
カラム温度: 20 °C
流量: 0.3 mL/min
注入量: 2 µL + 3 秒フラッシュ

**MS 条件**

イオン化モード: エレクトロスプレー
イオン化極性: ポジティブイオン化 *
乾燥ガス流量: 10 L/min
乾燥ガス温度: 250 °C
ネブライザ圧力: 35 psi
スキャン範囲: m/z 50 ～ 950
フラグメンター電圧: 170 V
キャピラリ電圧: 4,000 V
リファレンスマス: m/z 121、922
リファレンスマス流量: 10 µL/min

*ポジティブとネガティブ両方のイオン化データの取り込みで測定しましたが、このアプリケーションノートではポジティブイオンデータの解析だけを取り扱いました。

**機器条件 – LC/Q-TOF MS/MS**

**LC 条件**

カラム: ZORBAX SB-Aq カラム 2.1 x 150 mm、3.5 µm
移動相:
　A = 0.1% ギ酸水溶液
　B = 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント:
　2% B 0 分
　98% B 46 分
　98% B 54.9 分
　2% B 55 分
MS stop 時間: 54.9 分
LC stop 時間: 55 分
LC ポストタイム: 7 分
カラム温度: 20 °C
流量: 0.3 mL/min
注入量: 2 µL

**MS 条件**

イオン化モード: エレクトロスプレー
イオン化極性: ポジティブイオン化
乾燥ガス流量: 10 L/min
乾燥ガス温度: 250 °C
ネブライザ圧力: 40 psig
スキャン範囲
　MS: m/z 100 ～ 1,000、250 ms/スペクトル
　MS/MS: m/z 100 ～ 1,000、250 ms/スペクトル
衝突エネルギー: 5 x +10eV
アイソレーション: ミディアム
フラグメンター電圧: 170 V
スキマー電圧: 65 V
オクトポール RF 電圧: 750 V
キャピラリ電圧: 4,000 V
リファレンスマス: m/z 121、922
リファレンスマス流量: 10 µL/min
リファレンスネブライザ圧力: 15 psig

化合物を見つけた後、バックグラウンドを減算しました。荷電状態は 1 に設定しました。アルゴリズムで塩の付加イオン ($Na^+$ と $K^+$) を同定し、プロトン化分子 [$M+H^+$] と関連付加イオンを 1 つの化合物として処理しました。最後に、アルゴリズムで同位体を同定しました。各特徴ピークに対して、モノアイソトピック質量とリテンションタイムをレポートしました。モノアイソトピック質量と同位体比を用いて、各特徴ピークの 1 次組成式を計算しました。

次に、Agilent GeneSpring MS ソフトウェアでの二次的な分析のために、MassHunter ワークステーションソフトウェアにより作成されたリテンションタイム/質量の組み合わせをエキスポートしました。使用したワークフローは以下のとおりです (図 4 を参照):

1. 特徴ピークのアライメント（Alignment）とノーマライゼーション(normalization)
2. データ品質を確認する階層的クラスタ(clustering)
3. 一元配置 (1-way analysis)と二元配置 (2-way analysis) の分散解析 (ANOVA) を用いた、分類全体にわたるアバンダンスの差による特徴ピークの同定
4. 分類のディスクリミネーションを示す主成分分析 (PCA) の実施
5. 倍率変更 (fold changes) の視覚化

ここまでの分析の結果は、実験分類間のアバンダンスの統計的に大きな変動を示す代謝物の質量リストでした。

6. METLIN パーソナル代謝物データベースによる質量リストの検索

その後、Q-TOF LC/MS システムの標的 MS/MS を用いてサンプルを再分析し、さらにデータ解析を行いました。

7. 取り込んだ Q-TOF スペクトルによる代謝物データベース検索結果の比較

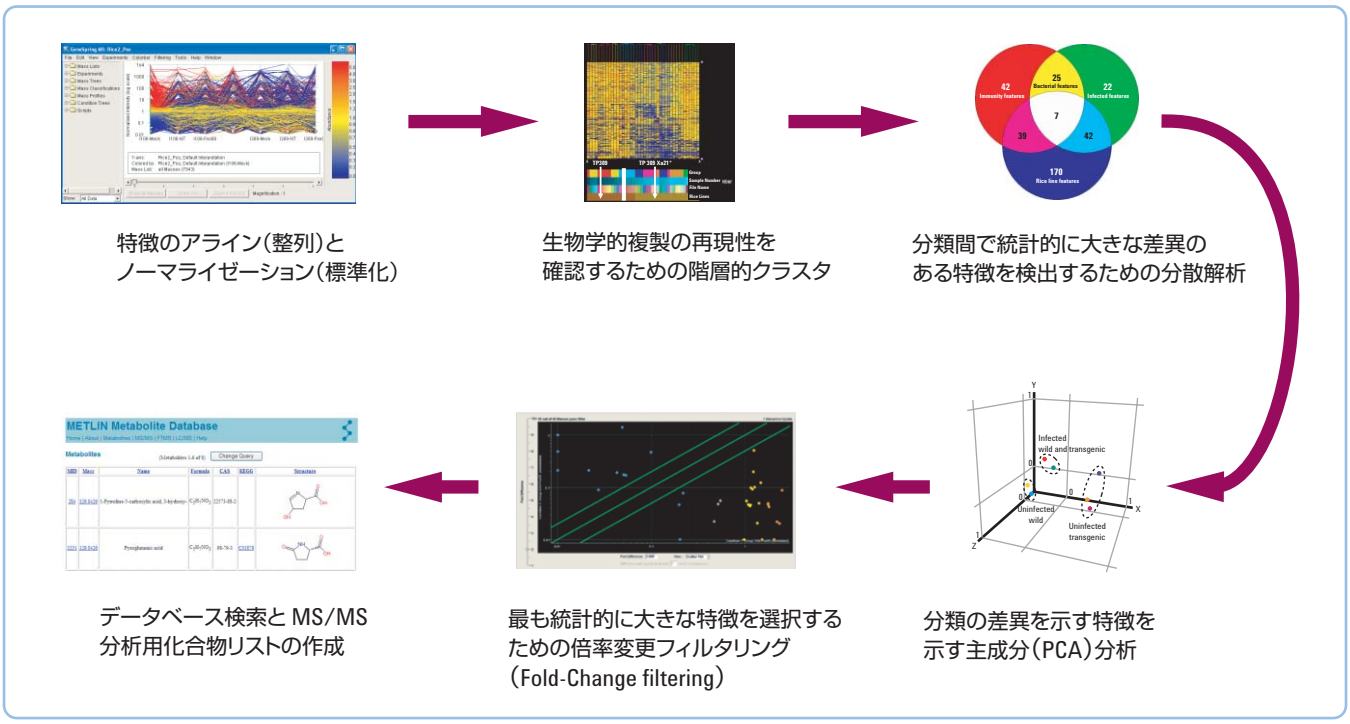



**図 4. MS プロファイリングデータの GeneSpring MS 分析のワークフロー**

## 結果と考察

### イネ/細菌相互作用の形態

TP309 は、PXO99 または不活性 PXO99-raxST⁻ のいずれか一方に耐性がありません (図 5)。TP309 には、*Xoo* の株を認識するか、免疫反応を始動させるメカニズムが欠如しています。

TP309-Xa21 は、PXO99 に耐性があります。*Xa21* 遺伝子は、PXO99 で生成される AvrXa21 ペプチドを認識および結合する受容タンパク質を生成することで抵抗を与えます。これにより、免疫反応を始動させます。

TP309-Xa21 は、PXO99-raxST⁻ に耐性がありません。PXO99-raxST⁻ は AvrXa21 を生成しないため、TP309-Xa21 には病原菌を認識する方法がなく、免疫反応を開始しません。

**図 5. 疾病と健康な状態を示すイネの葉**

### 分類の差を同定する分散の一元配置分析

分散解析 (ANOVA) は、実験に存在する変動を解析するための強力なツールです。ペアワイズ比較(pair-wise comparison)だけを行う t-検定（t-test）と異なり、ANOVA でどんな数のデータセットも解析できます。t-検定が独立しているため、複数ではそれらのエラーは累積されます。7 つの分類によるこのイネの実験の場合、合計 21 の t-検定を行う必要がありました。1 つの t-検定のタイプ I のエラー (偽陽性) の可能性が 0.05 の場合、エラーの累積可能性は 1.00 以上になりました。一元配置（1-way) ANOVA の大きな利点は、いくつの条件を含んでもエラーの可能性が同じままであることです。この実験に一元配置（1-way) ANOVA を用いたタイプ I のエラーの可能性は、累積 t-検定を用いた場合よりも少なくなります。

図 6 に、すべてのペアワイズ比較に対して Tukey ポストホック検定(post-hoc test)を適用した後の ANOVA ($P < 0.05$) の結果を示します。青色のボックスは、統計的に大きい差のない特徴ピークの数です。赤色のボックスは、統計的に大きな差のある特徴ピークの数です。統計的に大きな差のある特徴ピークはバイオマーカーである可能性があり、生物学上にも興味深い研究対象です。これらをさらに分析しました。

イネ系統間の差の原因となる代謝物を検出するために、感染性への PXO99 の影響を分析しました。ANOVA 解析からの 3 つのペアワイズ比較の結果:

- TP309-Xa21—PXO99 vs. TP309-Xa21—Mock
- TP309—PXO99 vs. TP309—Mock
- TP309—Mock vs. TP309-Xa21—Mock

を詳細研究のために組み合わせました (図 7)。3 つの比較により、合計 347 の固有の統計的に大きな特徴がありました。分析による検出結果:

- 免疫特徴ピーク (42)抵抗に関連する可能性のある代謝物
- 感染特徴ピーク (22)感染反応に関連する可能性のある代謝物
- 細菌特徴ピーク (25)細菌により生成されるか、反応する可能性のある代謝物
- イネ系統特徴ピーク (170)イネ系統の違いに関連する代謝物

| | Xa21-Mock | Xa21-NT | Xa21-Pxo99 | Xa21_Pxo99/RaxST- | TP309-Mock | TP309-NT | TP309-Pxo99 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Xa21-Mock | 564 | 124 | 113 | 167 | 258 | 290 | 219 |
| Xa21-NT | 44 | 564 | 109 | 178 | 236 | 264 | 210 |
| Xa21-Pxo99 | 45 | 456 | 564 | 168 | 242 | 289 | 204 |
| Xa21_Pxo99/RaxST- | 39 | 386 | 396 | 564 | 141 | 197 | 111 |
| TP309-Mock | 30 | 328 | 322 | 423 | 564 | 78 | 96 |
| TP309-NT | 27 | 300 | 275 | 367 | 486 | 564 | 141 |
| TP309-Pxo99 | 34 | 354 | 360 | 453 | 469 | 423 | 564 |

**図 6. MS プロファイリングデータの ANOVA ($P < 0.05$) により、ペアワイズ比較で統計的にあまり大きくない差異 (青色) と統計的に大きな差異 (赤色) を示す特徴ピークを同定しました。例えば、TP309-Xa21 での Mock チャレンジの結果を TP309-Xa21 での PXO99 チャレンジと比較し、発現レベルで統計的に大きな差異として 113 の特徴ピークを見いだしました。**

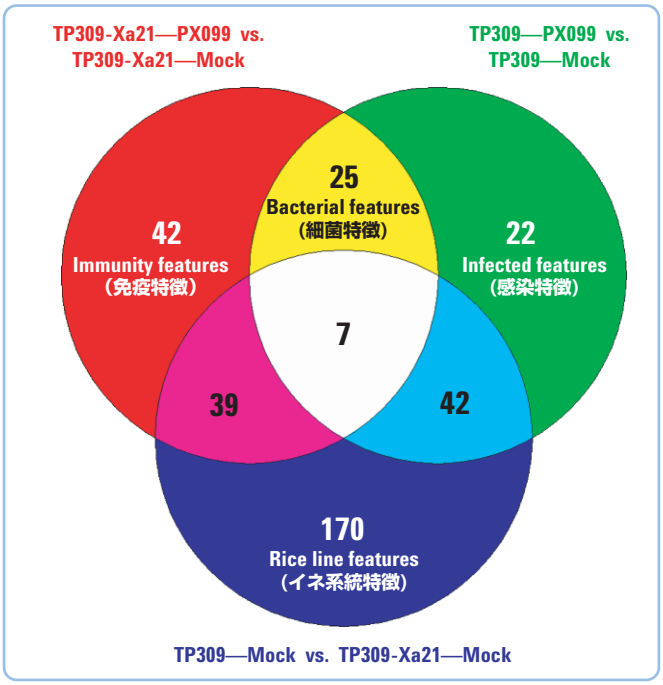



**図 7. 3 つのペアワイズ比較による ANOVA 結果の組み合わせにより、合計 347 の固有の統計的に大きな特徴ピークが得られました。これらの中で、42 は免疫に、22 は感染に、25 は細菌に、170 はイネ系統に関連がありました**

## 主成分分析 (PCA,Principle component analysis)

PCA は、複雑なデータを少ない変数に圧縮する数学的メソッドです。目的は、データの違いの主な原因となる、新しい変数 (主成分) を探索することです。データのプレフィルタリングなしに GeneSpring MS ソフトウェアを用いて PCA を行う際に、TP309 と TP309-Xa21 イネ系統の分離を観察しました (図 8a)。

この実験では、単に 2 つのイネ系統間の差別化だけではなく、免疫と防御特徴に関する情報を得ることが目的でした。一元配置 ANOVA（1-way ANOVA） を PCA に組み合わせて、イネ系統の違いをより明確に、イネ系統にかかわらない感染状態の区別もより簡単にしました (図 8b)。

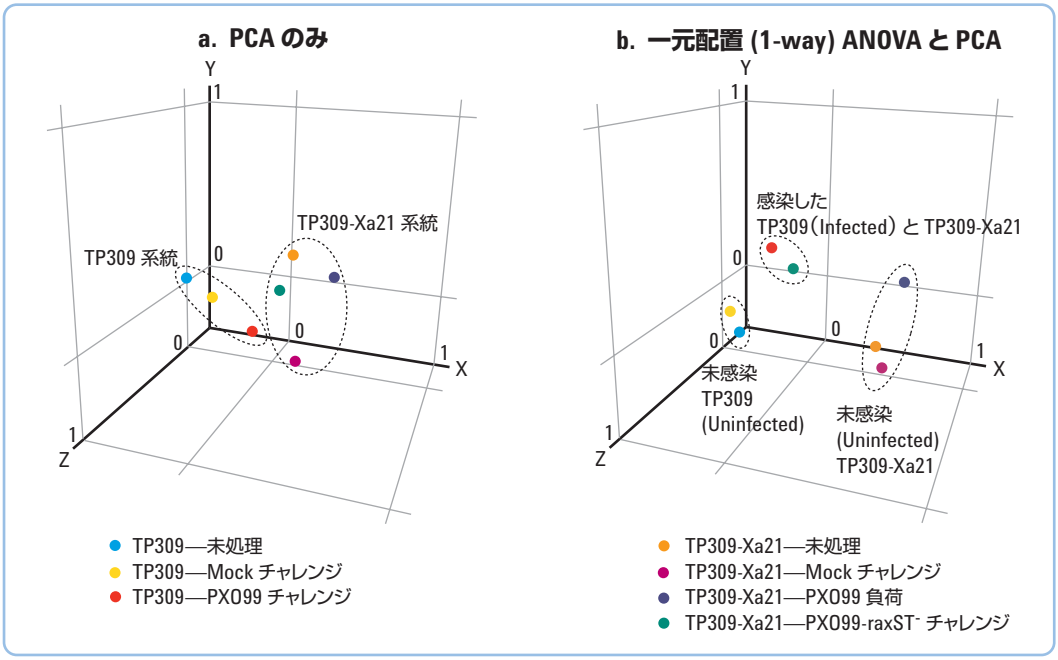



**図 8. データのプレフィルタリングを用いない主成分分析により、イネ系統間の区別が可能になりました。PCA を一元配置（1-way) ANOVA と組み合わせると (b)、イネ系統だけでなく、イネ系統にかかわらずに感染状態の区別もより簡単でした**

### 二元配置 ANOVA(2-way ANOVA) により、イネ系統と分類の違いを同時に測定します。

二元配置 ANOVA は、処理の組み合わせを研究するための強力なツールです。パラメータは、組み合わせごとに比較します。これらの特徴ピークに関する事前の知識は必要ありません。二元配置 ANOVA を行った後、ベン図をプロットしました (図 9)。結果の内容:

- 360 の特徴ピークで 2 つのイネ系統間の分散を説明しました
- 41 の特徴ピークだけですべての分類の分離に充分でした
- 30 の特徴ピークですべてのイネ系統と分類を分離しました

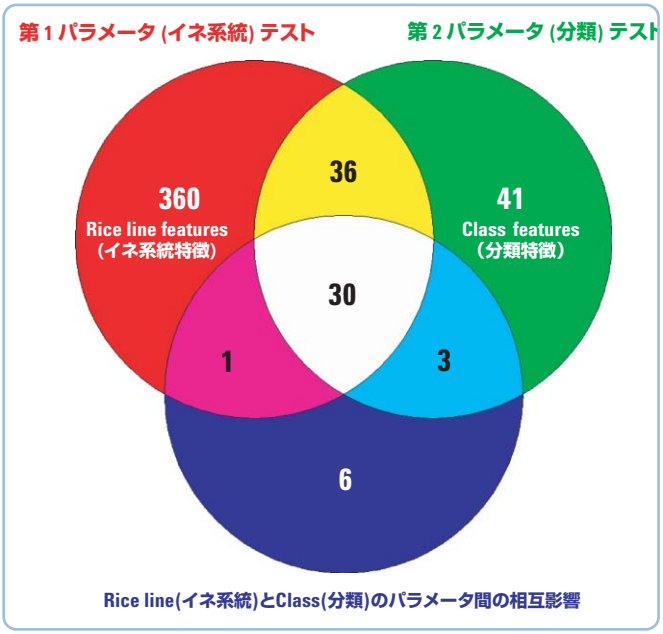



**図 9. 二元配置 ANOVA による分析により、すべての分類とイネ系統を一緒に分離する 30 の特徴を同定しました**

次に、PCA でこれら 30 の大きな特徴ピークを処理し、イネ系統と分類の分離を実証しました。PXO99-raxST⁻ による負荷を受ける TP309-Xa21 を除き、TP309-Xa21 分類はグループを作ります。これにより、感染した分類の TP309 – XO99 負荷とグループ化しました (図 10)。

これらの結果は、これらのイネ系統と細菌の遺伝子型や表現型に対する既報の結果と一致します。

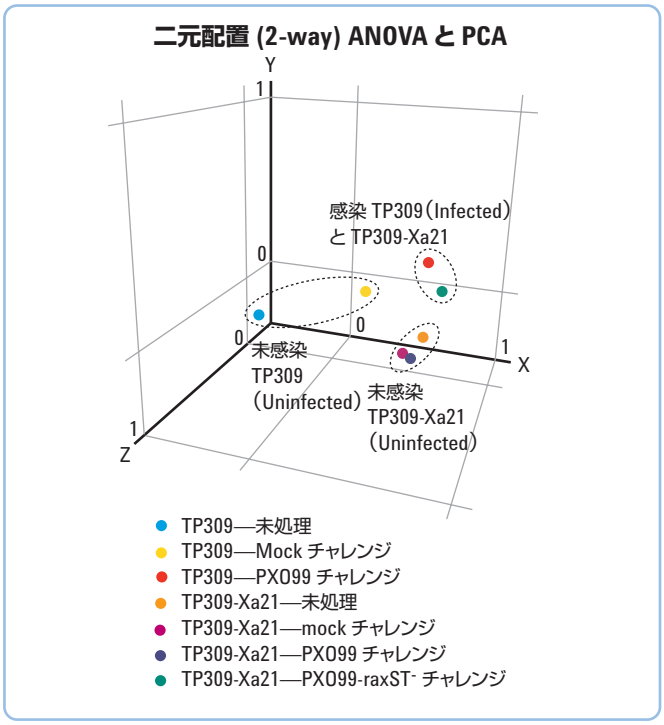



**図 10. 二元配置 ANOVA により検出された 30 の大きな特徴ピークの PCA 分析ではイネ系統を明確に区別し、同時に感染した分類も一緒にグループ化できました**

### 倍率変更フィルタリング(Fold-change filtering)と視覚化 (visualizaton)

どの特徴(代謝物) が最も関連性が高いかを究明するために、倍率変更フィルタリング (図 11) を別の統計ツールとして使用しました。模擬感染 (Mock Infection) に対する倍率変更が大きいほど、特定の代謝物が関連する可能性がより高くなります。GeneSpring MS ソフトウェアでは倍率変更が対話形式であるため、倍率変更リミット値を簡単に変更し、変更がフィルターを通過する特徴ピークの数にどのような影響を及ぼすかを究明しました。

GeneSpring MS ソフトウェアには、視覚化オプションとして Volcano プロットが用意されていますが、この分析では使用しませんでした。Volcano プロットは、シングル視覚化での倍率変更フィルタリングと t-検定の結果を組み合わせます。両方のテストの基準を対話式に変更し、最も関連性の高い特徴ピークが検出できます。

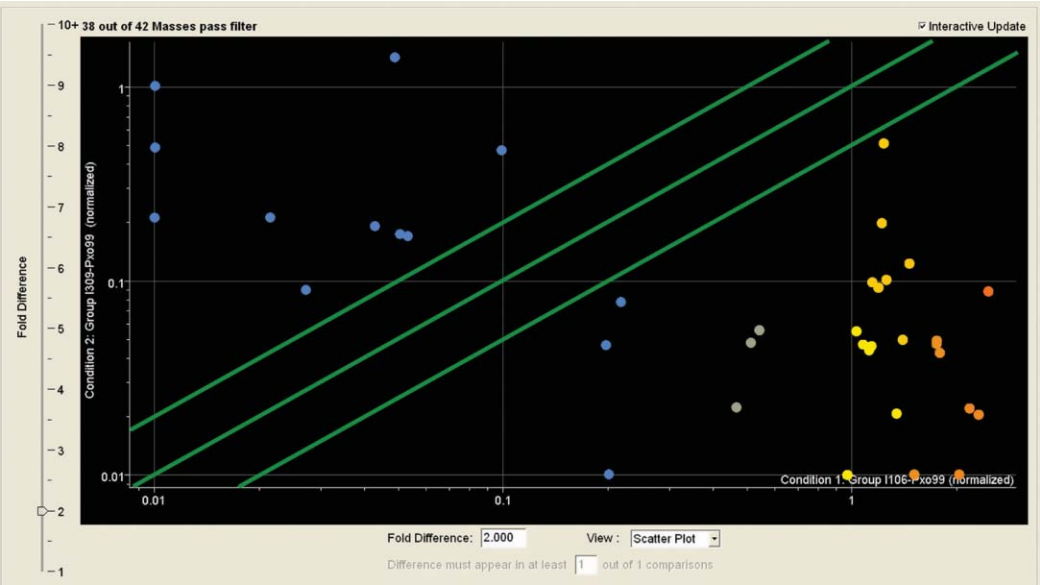



**図 11. 一元配置 ANOVA の結果の対話形式による倍率変更フィルタリングは、どの特徴 (代謝物) ピークが最も関連性が高いかという究明に役立ちました**

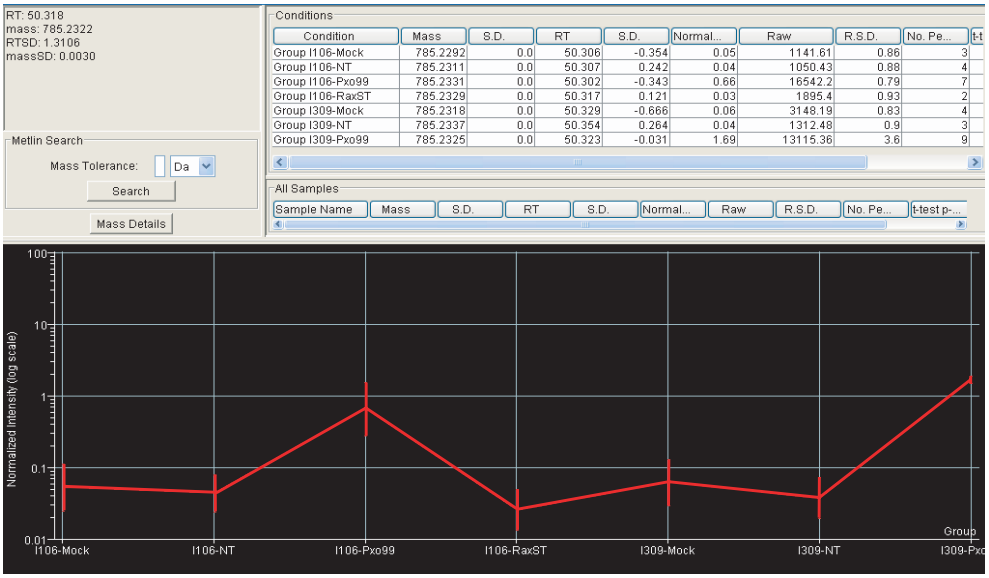
## 特徴ピークの点検(Feature inspection)

GeneSpring MS ソフトウェアの 2 つの追加機能を用いて、個々の特徴ピークの追加分析を行いました。1 つ目は、個々の特徴ピークのデータを調査することが可能な「質量インスペクタ（mass inspector)」ビュー(view)です。2 つ目は、Microsoft® Excel と互換性のあるタブ区切り形式の質量リストの特徴ピークに関連するデータをエクスポートする能力です。

## 質量インスペクタビュー(mass inspector view)

GeneSpring MS ソフトウェアの質量インスペクタビューにより、すべての必要な分類にわたる特定の特徴ピークの相対アバンダンスの比較が可能になりました (図 12 参照)。これにより、特定の特徴ピークが示されているか、たとえば一部の実験分類で存在するが、他の分類では存在しない場合のオン/オフの挙動を確認することが簡単になりました。オン/オフの挙動は、可能性のある関連性の貴重な指標です。質量インスペクタビューでは、リテンションタイム、分子量、標準偏差、t-検定の意味、調査されている特徴ピークについてなどの、追加情報も提供します。

**図 12. GeneSpring MS ソフトウェアの質量インスペクタビューにより、分類全体にわたり個々の特徴 (代謝物) ピーク アバンダンスを比較できました。また、リテンションタイム、分子量、標準偏差、t-検定の意味などの他の有益な特徴ピーク情報が表示されます**




Microsoft は Microsoft Corporation の米国登録商標です。

### Excel へのエクスポート

GeneSpring MS ソフトウェアの別の特徴機能を用いて、倍率変更フィルタ通過した免疫特徴に関連するすべてのデータをタブ区切り形式でエクスポートしました。スプレッドシートでのデータの操作により、データを Up-regulated と Down-regulated された両方の特徴ピークのリストに分割することができました (表 2 と 3)。特に興味深いことは、1 つまたは 2 つの分類にない特徴ピーク (表で強調表示) でした。これらの特徴ピークはオン/オフ代謝物である可能性があり、さらに調査するためにフラグをつけました。

**表 2. 倍率変更フィルタを通過した TP309-Xa21 − XO99 分類 (免疫) からの Up-regulated された代謝物**

| リテンションタイム (分) | 質量 (u) | 倍率変更 |
|---|---|---|
| 32.64 | 771.4705 | 2.4 |
| 1.11 | 296.9389 | 2.8 |
| 32.76 | 710.4604 | 4.2 |
| 41.36 | 167.0575 | 6.1 |
| 43.74 | 401.3279 | 9.7 |
| 40.60 | 849.5386 | 10.7 |
| 31.24 | 295.2517 | 11.5 |
| 25.80 | 329.2925 | 11.9 |
| 27.20 | 453.2855 | 12.4 |
| 32.66 | 739.4514 | 12.9 |
| 47.38 | 934.5473 | 18.6 |
| 46.41 | 660.5333 | 20.3 |
| 50.91 | 565.8811 | 20.7 |
| 49.41 | 948.5989 | 23.2 |
| 2.38 | 221.0538 | 24.8 |
| 45.17 | 817.5082 | 25.0 |
| 37.68 | 608.2646 | 27.8 |
| 38.53 | 861.5044 | 28.0 |
| 2.07 | 129.0414 | 35.5 |
| 2.10 | 122.0383 | 36.2 |
| 37.25 | 624.2587 | 41.8 |
| 53.60 | 945.6066 | 64.5 |
| 53.31 | 93.0454 | 97.1 |
| 2.06 | 385.1011 | 98.6 |
| 52.22 | 157.9583 | 112.7 |
| 51.76 | 580.4290 | 151.1 |
| 51.35 | 225.9444 | 203.8 |

### 標的代謝物の同定

代謝物プロファイリングにより、代謝物調査の次の段階である標的代謝物の同定のために選択された Up-regulated された免疫特徴ピークのリストを示しました。2 段階のプロセスで代謝物の暫定的な同定を行いました。

まず、プロファイリング処理で同定された各標的質量を METLIN パーソナル代謝物データベースで検索しました。±10 ppm の狭い質量ウィンドウでデータベースを検索しました。これは最高 2 ppm の 6210 TOF の質量精度よりも大幅に広いですが、狭すぎるウィンドウを用いることで正しい一致を除外する可能性よりも、追加のヒットを見直すほうが良いと判断しました。実験式計算を質量誤差 5 ppm、実験式の最大数 100 に設定しました。表 4 に元素に対する設定値を示します。

**表 3. 倍率変更フィルタを通過した TP309-Xa21 − XO99 分類 (免疫) からの Down-regulated された代謝物**

| リテンションタイム (分) | 質量 (u) | 倍率変更 |
|---|---|---|
| 1.09 | 213.9057 | 3.2 |
| 45.66 | 452.3297 | 3.3 |
| 32.52 | 600.4134 | 3.4 |
| 1.09 | 73.0268 | 4.4 |
| 36.95 | 281.6063 | 4.9 |
| 1.09 | 109.1268 | 10.0 |
| 47.21 | 524.3837 | 21.3 |
| 1.28 | 103.0648 | 21.6 |
| 46.57 | 652.4474 | 29.2 |
| 1.43 | 95.9816 | 48.3 |
| 47.20 | 540.3579 | 101.8 |

**表 4. METLIN データベース検索の最小および最大元素設定**

| 元素 | 最小数 | 最大数 |
|---|---|---|
| 炭素 | 1 | 100 |
| 水素 | 1 | 400 |
| 窒素 | 0 | 20 |
| 酸素 | 0 | 20 |
| リン | 0 | 1 |
| 硫黄 | 0 | 1 |
| フッ素 | 0 | 6 |

METLIN パーソナル代謝物データベースの検索結果を、元の質量リストとともにスプレッドシートに組み込みました (表 5 と 6)。すべての代謝物に対して検索で一致しないことは驚くことではありません。質量ウィンドウを広くすると可能性のある代謝物 ID の数は増えますが、間違った ID の数も増えます。15,000 を超えるエントリーを持つ METLIN データベースは、世界中で最も総合的な市販のデータベースで、その数はすべての可能性のある代謝物のほんのわずかにすぎません。示したように、データベース検索で一致すると、同定の非常に貴重な助けになる可能性があります。

**表 5. METLIN 検索結果による TP309-Xa21 – PXO99 分類 (免疫) からの Up-regulated された代謝物**

| リテンションタイム (分) | 質量 (u) | 倍率変更 | 実験式 | 化学式の数 | METLIN 検索 (ヒット数) |
|---|---|---|---|---|---|
| 32.64 | 771.4705 | 2.4 | C27H68N10O13P | 93 | 0 |
| 1.11 | 296.9389 | 2.8 | C7HNO8F2S | 13 | 0 |
| 32.76 | 710.4604 | 4.2 | C38H60N7O6 | 71 | 0 |
| 41.36 | 167.0575 | 6.1 | C6H7N4O2 | 3 | 3 |
| 43.74 | 401.3279 | 9.7 | C24H41N4O | 9 | 0 |
| 40.60 | 849.5386 | 10.7 | C29H72N17O10P | 100 | 0 |
| 31.24 | 295.2517 | 11.5 | C18H33NO2 | 2 | 0 |
| 25.80 | 329.2925 | 11.9 | C19H39NO3 | 2 | 0 |
| 27.20 | 453.2855 | 12.4 | C9H31N19O3 | 20 | 0 |
| 32.66 | 739.4514 | 12.9 | C32H65N7O10S | 85 | 0 |
| 47.38 | 934.5473 | 18.6 | C53H79N2O10P | 100 | 0 |
| 46.41 | 660.5333 | 20.3 | C25H62N19O2 | 32 | 0 |
| 50.91 | 565.8811 | 20.7 | C4HN6O16F6PS | 32 | 0 |
| 49.41 | 948.5989 | 23.2 | C58H76N8O4 | 100 | 0 |
| 2.38 | 221.0538 | 24.8 | C6H7N5O3 | 4 | 0 |
| 45.17 | 817.5082 | 25.0 | C34H63N19O3S | 100 | 0 |
| 37.68 | 608.2646 | 27.8 | C25H45N4O9PS | 75 | Harderoporphyrin |
| 38.53 | 861.5044 | 28.0 | C47H70N6O7P | 100 | erythromycin ethylsuccinate |
| 2.07 | 129.0414 | 35.5 | C5H7NO3 | 1 | 6 |
| 2.10 | 122.0383 | 36.2 | C7H6O2 | 2 | benzoic acid |
| 37.25 | 624.2587 | 41.8 | C30H33N12O2P | 85 | 0 |
| 53.60 | 945.6066 | 64.5 | C60H79N7OS | 100 | 0 |
| 53.31 | 93.0454 | 97.1 | C5H5N2 | 2 | 0 |
| 2.06 | 385.1011 | 98.6 | C17H18N6OPS | 36 | 0 |
| 52.22 | 157.9583 | 112.7 | C3HN3OPS | 1 | 0 |
| 51.76 | 580.4290 | 151.1 | C24H57N10O4P | 30 | Vitamin K2 |
| 51.35 | 225.9444 | 203.8 | C4HF6PS | 4 | 0 |

**表 6. METLIN 検索結果による TP309-Xa21 − PXO99 分類 (免疫) からの Down-regulated された代謝物**

| リテンションタイム (分) | 質量 (u) | 倍率変更 | 実験式 | 化学式の数 | METLIN 検索 (ヒット数) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.09 | 213.9057 | 3.2 | none | 0 | 0 |
| 45.66 | 452.3297 | 3.3 | C23H44N6OS | 17 | 0 |
| 32.52 | 600.4134 | 3.4 | C22H57N12O3PS | 40 | Violaxanthin, Neoxanthin |
| 1.09 | 73.0268 | 4.4 | CHNF2P | 1 | 0 |
| 36.95 | 281.6063 | 4.9 | none | 0 | 0 |
| 1.09 | 109.1268 | 10.0 | none | 0 | 0 |
| 47.21 | 524.3837 | 21.3 | C30H48N6O2 | 24 | 0 |
| 1.28 | 103.0648 | 21.6 | none | 0 | 0 |
| 46.57 | 652.4474 | 29.2 | C29H59N13PS | 48 | 0 |
| 1.43 | 95.9816 | 48.3 | none | 0 | 0 |
| 47.20 | 540.3579 | 101.8 | C29H47N7OP | 32 | 0 |

同定プロセスの 2 番目の部分では、Up-regulated された免疫特徴の 1 つ、表 5 の *m/z* 129.0414 をさらに調査するために選択しました。Q-TOF LC/MS システムでサンプルを再分析しました。使用した分離とイオン源の測定条件は、元の TOF 分析の測定条件と同じです。MS/MS スペクトルは、標的質量リストの各代謝物から取り込みました。

選択した代謝物の MS/MS スペクトルの調査 (図 13) では、プリカーサイオンからのカルボキシル基 (ギ酸 - $CH_2O_2$) の損失を示すベースピークを示しました。2 番目に大きなピークは CO の二次的損失を示しました。

METLIN データベース検索結果 (図 14) に含まれる分子構造に対して MS/MS スペクトルを評価することで、6 つの可能性のある代謝物の 2 つ (ピログルタミン酸とピロリドンカルボン酸) だけが、観察された損失を論理的に生じることが分かりました。これら 2 つの化合物は質量分析で識別できない鏡像異性体です。代謝物の正確な正体を入手することが重要な場合、標準とキラル LC カラムを用いた再分析を通じて決定できます。

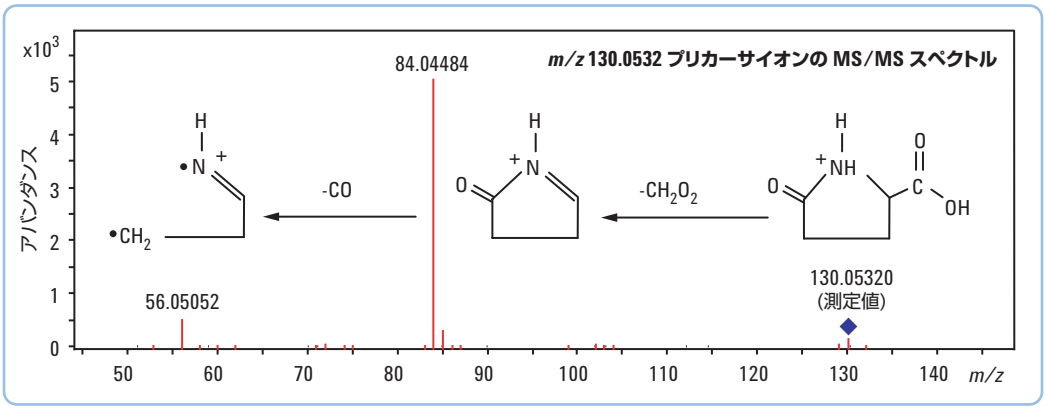
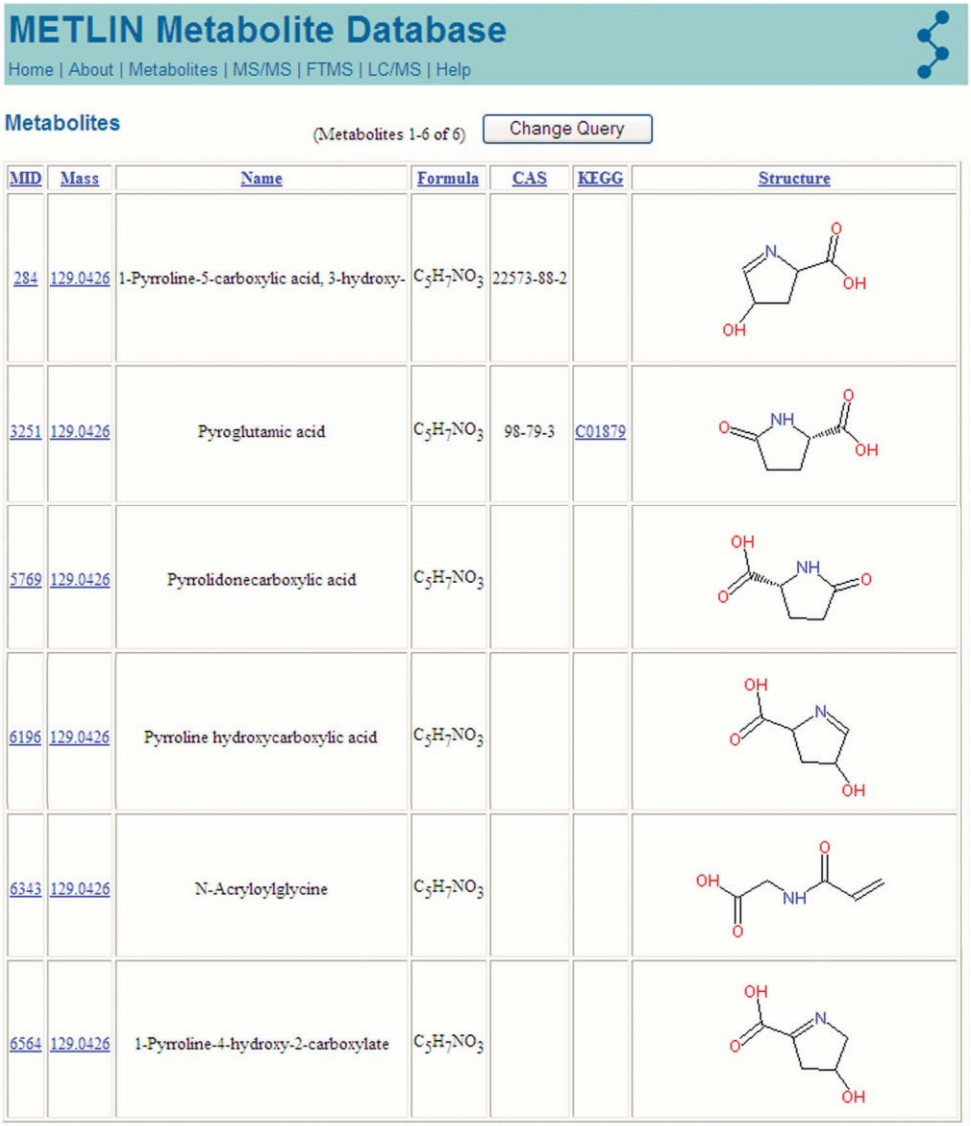



**図 13. *m/z* 130.0532 のプリカーサイオンの MS/MS スペクトルは、ギ酸 ($CH_2O_2$) の損失を表すベースピークと CO の二次的な損失を表すピークを示します。METLIN 代謝物データベースの検索で作成された 6 つの可能性のある対象物の構造に対してこの情報を評価することで、可能性のある対象物のリストが 2 つまで絞られました**




| MID | Mass | Name | Formula | CAS | KEGG | Structure |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 284 | 129.0426 | 1-Pyrroline-5-carboxylic acid, 3-hydroxy- | $C_5H_7NO_3$ | 22573-88-2 | | |
| 3251 | 129.0426 | Pyroglutamic acid | $C_5H_7NO_3$ | 98-79-3 | C01879 | |
| 5769 | 129.0426 | Pyrrolidonecarboxylic acid | $C_5H_7NO_3$ | | | |
| 6196 | 129.0426 | Pyrroline hydroxycarboxylic acid | $C_5H_7NO_3$ | | | |
| 6343 | 129.0426 | N-Acryloylglycine | $C_5H_7NO_3$ | | | |
| 6564 | 129.0426 | 1-Pyrroline-4-hydroxy-2-carboxylate | $C_5H_7NO_3$ | | | |

**図 14. METLIN パーソナル代謝物データベースの検索により、約 129.0414 u の分子量を持つ代謝物に対する 6 つの可能性のある化合物のリストを作成しました**

## 結論

イネと細菌性白葉枯れ病 (BLB) の感染と免疫のメカニズムをよく理解するために、感染や抵抗に関連する代謝物を同定する研究を行い、2 つの LC/MS 手法を使用しました。Time-of-Flight (TOF) 質量分析計 (MS) を用いたサンプルの高速異差発現分析の後、Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) MS/MS を用いた異差発現した代謝物の標的同定を行いました。

合計 7 つの異なる分類を比較しました。さまざまなイネ/細菌分類の代謝物には明確な違いが検出されました。比較的少ない代謝物に基づき、イネ系統と感染の状態を明確に区別できました。

この種の研究では、機器とソフトウェア要件についても、検討しました。必要な複製の数は自然 (サンプル) の多様性と技術 (機器) の多様性により決定されます。この実験では、イネと細菌の自然の相違は、自己複製による繰り返しを必要としました。しかし、プロファイリングのために使用した Agilent 6210 Time-of-Flight LC/MS システムの優れた再現性により、技術的な繰り返し実験は必要ありませんでした。

データ解析は、大規模メタボロミクス研究で重要な役割を担います。本研究から、さまざまな統計分析ツールを持つことが最高の結果を得るために不可欠であることがわかりました。主成分分析 (PCA) によるプロファイリングデータの解析から、2 つのイネ系統が区別できました。PCA と一元配置または二元配置分散解析 (ANOVA) の組み合わせにより、イネ系統だけでなく、イネ系統にかかわらない感染状態も明確に区別できました。倍率変更フィルタリングを適用し、結果を視覚化することにより、アバンダンスの差の比較と、研究の第 2 段階である代謝物同定の標的の選択が簡単に行えました。データ解析に使用した Agilent GeneSpring MS ソフトウェアの広範囲に及ぶ統計分析により、多くの情報を入手できました。

2 つの要素により、プロファイリング段階から代謝物同定段階への進行は容易に行えました。1 つ目の要素は、TOF プロファイリングデータの優れた質量精度と、強力な METLIN パーソナル代謝物データベースにより、可能性のある代謝物 ID を管理可能な数に絞り込めたことです。もう一つの要素は、Agilent 6510 Q-TOF LC/MS を用いた追加分析で得られた MS/MS スペクトルにより、代謝物を 2 つの鏡像異性体の 1 つと同定できたことです。加えて、メタボロミクスの課題も明らかになりました。市販の最大の代謝物データベースと精密質量 MS/MS スペクトルを使用しても、一部の化合物の最終的な同定にはさらに分析が必要になることです。この場合、標準とキラル LC カラムを用いて必要な追加分析を行うことになります。

## 参考文献

1. Song et. al. (1995) *Science* 270: 1804–1806
2. Sang-Wong Lee et. al. PNAS, 103(49) 18395–18400, 2006
3. Weckworth et. al. *Proteomics* 2004, 4, 78–83

### アジレント・テクノロジーについて

アジレント・テクノロジーは、ライフサイエンス研究システム分野のリーディングサプライヤとして、複雑な生物学プロセスの研究、疾病メカニズムの解明、創薬の迅速化に貢献しています。感度、再現性、ワークフロー生産性について熟慮し、ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどのアプリケーションに対し、各種機器はもちろん、マイクロ流体装置、ソフトウェア、マイクロアレイ、消耗品、サービスまで、必要なソリューションを提供します。

**詳細情報:**
www.agilent.com/chem/jp

**カストマコンタクトセンタ**
0120-477-111

本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan、May 20, 2009

5989-6234JAJP

Agilent Technologies